

SKRIPSI

**PENGARUH WAKTU EKUILIBRASI DAN WAKTU *PRE FREEZING*
TERHADAP MEMBRAN PLASMA UTUH (MPU) DAN TUDUNG
AKROSOM UTUH (TAU) SPERMATOZOA SAPI BALI**

Disusun dan diajukan oleh

**RAJAMUDDIN
I011 18 1010**



**PROGRAM STUDI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

**PENGARUH WAKTU EKUILIBRASI DAN WAKTU *PRE FREEZING*
TERHADAP MEMBRAN PLASMA UTUH (MPU) DAN TUDUNG
AKROSOM UTUH (TAU) SPERMATOZOA SAPI BALI**

SKRIPSI

**RAJAMUDDIN
I011181010**

Skripsi sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Peternakan
pada Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin

**PROGRAM STUDI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH WAKTU EKUILIBRASI DAN WAKTU *PRE FREEZING*
TERHADAP MEMBRAN PLASMA UTUH (MPU) DAN TUDUNG
AKROSOM UTUH (TAU) SPERMATOZOA SAPI BALI

Disusun dan diajukan
oleh

RAJAMUDDIN
I011181010

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk
dalam rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Program
Studi Peternakan Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin
Pada tanggal 12 September 2022
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Anggota

Prof. Ir. Muhammad Yusuf, S.Pt., Ph.D., IPU
NIP. 19700725 199903 1 001

Dr. Agr. Ir. Renny Fatmyah Utamy, S.Pt., M.Agr., IPM
NIP. 19720120 199803 2 001

Ketua Program Studi,



Dr. Ir. Sri Purwanti, S.Pt., M.Si., IPM ASEAN.Eng
NIP. 19751012003122002

LEMBAR KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Rajamuddin
NIM : I011181010
Program Studi : Peternakan
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul

Pengaruh Waktu Ekuilibrasi dan Waktu Pre Freezing terhadap Membran Plasma Utuh (MPU) dan Tudung Akrosom Utuh (TAU) Spermatozoa Sapi Bali.

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain bahwa skripsi yang saya tulis ini benar benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 12 September 2022



Yang menyatakan
(Rajamuddin)

ABSTRAK

RAJAMUDDIN. I011 18 1010. Pengaruh Waktu Ekuilibrasi Dan Waktu *Pre Freezing* Terhadap Membran Plasma Utuh (MPU) Dan Tudung Akrosom Utuh (TAU) Spermatozoa Sapi Bali. Pembimbing Utama: **Muhammad Yusuf** dan Pembimbing Anggota: **Renny Fatmyah Utamy**.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh waktu ekuilibrasi dan waktu *pre freezing* terhadap membran plasma utuh (MPU) dan tudung akrosom utuh (TAU) spermatozoa sapi Bali. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap faktorial dengan 2 faktor, yakni faktor E (waktu ekuilibrasi) dengan 3 perlakuan (E1=2 jam, E2=4 jam, dan E3= 6 jam) dan faktor P (waktu *pre freezing*) dengan 3 perlakuan (P1= 5 menit, P2= 10 menit, dan P3= 15 menit) ulangan sebanyak 3 kali (penampungan semen). Parameter yang diamati pada penelitian ini yaitu persentase MPU dan TAU. Pengamatan MPU menggunakan larutan Hypoosmotic Swelling Test (HOST) dengan melihat ekor spermatozoa yang melingkar, dan pengamatan TAU menggunakan larutan formosalin dengan melihat kepala spermatozoa yang berwarna hitam. Pengamatan menggunakan mikroskop trinokuler pembesaran 40×10. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu ekuilibrasi dan waktu *pre freezing* berpengaruh nyata terhadap persentase MPU dan TAU. Waktu ekuilibrasi tertinggi terdapat pada E2 dan tidak berbeda nyata terhadap E3. Namun berbeda nyata lebih tinggi dari E1. Waktu *pre freezing* tertinggi terdapat pada P2 dan tidak berbeda nyata terhadap P3. Namun berbeda nyata lebih tinggi dari P1. Persentase MPU tertinggi terdapat pada perlakuan E2P2 (Ekuilibrasi 4 jam dan 10 menit *pre freezing*) yakni 64,1% ($\pm 6,18$) dan Persentase terendah terdapat pada perlakuan E1P1 (Ekuilibrasi 2 jam dan 5 menit *Pre freezing*) yakni 33,4% ($\pm 0,51$). Persentase TAU tertinggi terdapat pada perlakuan E2P2 (Ekuilibrasi 4 jam dan 10 menit *pre freezing*) yakni 66,6% ($\pm 0,87$) dan Persentase terendah terdapat pada perlakuan E1P1 (Ekuilibrasi 2 jam dan 5 menit *pre freezing*) yakni 36,5% ($\pm 0,51$). Dapat disimpulkan bahwa waktu ekuilibrasi dan waktu *pre freezing* berpengaruh nyata terhadap MPU dan TAU spermatozoa sapi Bali pada saat pembekuan dan perlakuan terbaik terdapat pada E2P2 (Ekuilibrasi 4 jam dan 10 menit *pre freezing*) yang dapat mempertahankan kualitas spermatozoa lebih baik.

Kata kunci :Ekuilibrasi, *Pre freezing*, MPU, TAU, spermatozoa

ABSTRACT

RAJAMUDDIN. I011 18 1010. Effect of Equilibration Time and Pre Freezing Time on Plasma Membrane Integrity (MPU) and Acrosome Integrity (TAU) of Bali Bull Sperm. Supervised by **Muhammad Yusuf** and **Renny Fatmyah Utamy**.

This study aimed to determine the effect of equilibration time and pre freezing time on Plasma Membrane Integrity (MPU) and Acrosome Integrity (TAU) of Bali Bull Sperm. This study was using a randomized complete with a factorial pattern with two factors, namely factor E (equilibration time) with 3 treatments (E1=2 hours, E2=4 hours, and E3=6 hours) and factor P (pre freezing time) with 3 treatments (P1 = 5 minutes, P2 = 10 minutes, and P3 = 15 minutes) were replicated 3 times (cement storage). The parameters observed in this study were the percentage of MPU and TAU. MPU observations used a Hypoosmotic Swelling Test (HOST) solution by looking at the circular tail of the sperm, and TAU observations using a formasaline solution by looking at the black head of the sperm. Observations using a trinocular microscope with a magnification of 40×10. The results showed that the equilibration time and pre freezing time significantly affected the percentage of MPU and TAU. The highest equilibration time is at E2 and is not significantly different from E3. However, the difference is significantly higher than E1. The highest pre freezing time was found in P2 and was not significantly different from P3. However, the difference was significantly higher than P1. The highest MPU percentage was found in the E2P2 treatment (Equilibration 4 hours and 10 minutes pre freezing) which was 64.1% (± 6.18) and the lowest percentage was found in the E1P1 treatment (Equilibration 2 hours and 5 minutes Pre freezing) which was 33.4% (± 0.51). The highest percentage of TAU was found in the E2P2 treatment (Equilibration 4 hours and 10 minutes pre freezing) which was 66.6% (± 0.87) and the lowest percentage was found in the E1P1 treatment (Equilibration 2 hours and 5 minutes pre freezing) which was 36.5% (± 0.51). It can be concluded that the equilibration time and pre freezing time have a significant effect on MPU and TAU of Bali cattle sperm during freezing and the best treatment is E2P2 (4 hours and 10 minutes pre freezing) which can maintain better sperm quality.

Keywords: Equilibration, Pre freezing, MPU, TAU, sperm

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Puji Syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan rahmat dan karunianya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan segala keterbatasan. Berbagai kesulitan yang dihadapi penulis dalam penyusunan skripsi ini, namun berkat dukungan dan doa dari berbagai pihak sehingga kesulitan yang dihadapi penulis dapat dilewati dengan mudah. Terimakasih terucap bagi segenap pihak yang telah meluangkan waktu, pemikiran, dan tenaganya sehingga penyusunan skripsi ini selesai. Oleh sebab itu, penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Kedua orang tua tercinta **Muh. Saeni S.Ag.** dan **Salma S.Ag.** dengan peran yang luar biasa sepenuh hati memberikan dukungan moril dan spiritual serta ketulusan do'anya sehingga penulis dapat menyelesaikan studi S1 ini dengan baik.
2. **Prof. Ir. Muhammad Yusuf, S.Pt., Ph.D., IPU** selaku pembimbing utama dan **Dr. Agr. Ir. Renny Fatmyah Utamy, S.Pt., M.Agr., IPM.** selaku pembimbing anggota, yang telah meluangkan banyak waktu dan perhatiannya untuk membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyusun skripsi ini.
3. **Prof. Dr. Ir. Abdul Latief Tolleng, M.Sc.** dan **Dr. Hasbi, S.Pt., M.Si.** selaku penguji yang telah memberikan arahan dan masukan dalam proses perbaikan tugas akhir ini.
4. **Dr. Syahdar Baba, S.Pt., M.Si.** selaku Dekan Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, beserta jajarannya dan juga kepada dosen-dosen

pengajar Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin yang telah mengajarkan ilmu yang tak ternilai harganya kepada penulis, serta kepada staf fakultas yang telah membantu dalam proses pengurusan berkas selama penulis berkuliah.

5. **Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc.** selaku Rektor Universitas Hasanuddin, penulis ucapkan banyak terima kasih atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan sarjana (S1) pada program studi Peternakan.
6. **Prof. Dr. Ir. Ambo Ako, M.Sc.** selaku penasehat akademik penulis yang telah memberikan nasehat-nasehat selama perkuliahan.
7. **Ir. Sahiruddin, S.Pt., M.Si, IPM, ASEAN Eng., kakanda Hasrin S.Pt. M.Si,** dan Kakanda **Atthar Diansyah S.Pt.,** terima kasih atas segala bantuannya dalam mengarahkan dan membimbing penulis dalam pembuatan skripsi ini.
8. Kepala *CV. Samata Integrated Farming System* yang telah memberikan arahan dan masukan dalam proses penelitian tugas akhir ini.
9. Teman Seperjuangan HIMAKER (**Jumriani, Yodi Hardianto, Muh. Figri, Nur Fauzan Fikri, Andi Arisa,** dan **Sartika Ningsih**), terima kasih atas kebersamaannya yang mewarnai masa-masa perkuliahan.
10. Teman Seperjuangan dalam melaksanakan praktek kerja lapangan (**Jumriani, Yodi Hardianto, Nurul Awaliah Putri, Kiki Ramadani, Nur Izzatul Muminah,** dan **Sulhadawiah Kadir**), terima kasih atas segala bantuannya dalam penyelesaian skripsi ini.

11. Teman-teman seangkatan 2018, mereka adalah **CRANE18** yang tidak bisa disebutkan satu persatu. terima kasih atas kebersamaannya yang mewarnai masa-masa perkuliahan.

Semoga segala bentuk apresiasi mendapat imbalan yang layak dari Allah SWT. Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, sangat diharapkan saran dari pembaca sekalian. Terima kasih.

Makassar, 12 September 2022

Rajamuddin

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	vv
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
PENDAHULUAN	1
TINJAUAN PUSTAKA.....	5
Sapi Bali	5
Bioteknologi Inseminasi Buatan	5
Semen Beku.....	6
Tudung Akrosom Utuh.....	8
Membran Plasma Utuh.....	9
METODE PENELITIAN.....	12
Waktu dan Lokasi Penelitian.....	12
Alat dan Bahan	12
Rancangan Penelitian	12
Prosedur Penelitian.....	13
Metode Pelaksanaan	14
Parameter yang diamati	14
Analisis Data	19
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	21
Kualitas Semen Segar Sapi Bali	20
MPU Spermatozoa Sapi Bali <i>post thawing</i>	23
TAU Spermatozoa Sapi Bali <i>post thawing</i>	26
KESIMPULAN DAN SARAN.....	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN.....	37
RIWAYAT HIDUP.....	49

DAFTAR TABEL

No.	Halaman
1. Kualitas semen segar sapi Bali.....	20
2. MPU spermatozoa sapi Bali <i>post thawing</i>	24
3. TAU spermatozoa sapi Bali <i>post thawing</i>	27

DAFTAR GAMBAR

No.	Halaman
1. MPU spermatozoa sapi Bali <i>post thawing</i>	24
2. TAU spermatozoa sapi Bali <i>post thawing</i>	27

PENDAHULUAN

Dalam memenuhi kebutuhan daging sapi di Indonesia diperlukan pengembangan ternak sapi khususnya sapi potong lokal (Muzakkir dkk., 2017). Sapi Bali merupakan sapi potong lokal hasil domestikasi banteng (*Bibos banteng*), sapi Bali memiliki ciri genetik khas dan keunggulan yang tidak kalah jika dibandingkan dengan bangsa sapi lainnya. Perannya sangat penting dalam pembangunan subsektor peternakan (Hoesni, 2015). Guna mendukung pencapaian program swasembada sapi nasional untuk pemenuhan kebutuhan dalam negeri, maka perlu dilakukan peningkatan jumlah populasi sapi Bali, dalam hal ini perlu didukung dengan sistem pemeliharaan induk yang baik di tingkat peternak. Salah satu program tersebut yakni pemerintah mencanangkan program upaya khusus sapi indukan wajib bunting (UPSUS SIWAB) (Fania dkk., 2020). Pada 2020 Pemerintah memperluas cakupan output kegiatan UPSUS SIWAB, bukan hanya penambahan populasi akan tetapi sampai dengan penyediaan produksi daging sapi dalam negeri melalui program sapi kerbau komoditas andalan negeri (SIKOMANDAN) yang tertuang dalam Permentan Nomor 17/2020. Salah satu program utama dalam program SIKOMANDAN adalah peningkatan populasi melalui penerapan program Inseminasi Buatan (IB) (Iman dkk., 2021).

IB merupakan bioteknologi reproduksi terapan yang dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan populasi, produktivitas, dan mutu genetik ternak. Teknologi IB dianggap sebagai cara untuk meningkatkan populasi dan produktivitas ternak yang paling berhasil. Hal tersebut disebabkan karena IB lebih dapat diterima secara luas oleh peternak serta didukung dengan biaya pelaksanaannya yang relatif murah dan terjangkau (Susilawati, 2014). Selanjutnya

Rangkuti dkk (2021) menambahkan bahwa penggunaan semen beku banyak memberikan manfaat, di antaranya dapat mengoptimalkan fungsi pejantan, menghemat biaya pemeliharaan ternak jantan, dan semen beku lebih tahan lama karena bisa dipakai setelah beberapa tahun kemudian.

Aplikasi IB pada sapi Bali masih menemukan banyak kendala, terutama terbatasnya ketersediaan semen bekunya dan belum ditemukannya metode pembekuan yang tepat untuk mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa setelah pembekuan. Pembekuan semen adalah suatu proses penghentian sementara kegiatan hidup dari sel spermatozoa tanpa mematikan fungsi sel dan reaksi metaboliknya berhenti mendekati total (Susilawati dkk., 2000). Pembekuan semen merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi produksi semen beku karena dalam proses pembekuan akan mengakibatkan terjadinya kerusakan (Aisah dkk., 2017).

Masalah pembekuan semen terletak pada pengaruh *cold shock* terhadap sel yang dibekukan dan pembentukan kristal-kristal es. Kelemahan ini sebagian dapat diatasi dengan menggunakan zat-zat pelindung dalam pengencer dan penurunan suhu secara bertahap. Pelindung yang dapat digunakan adalah gliserol. Efisiensi gliserol pada masa pembekuan sangat dipengaruhi oleh waktu ekuilibrase. Hal ini didasarkan pada peranan gliserol dalam melindungi membran plasma, mencegah kerusakan fisik, dan fungsional sel sperma selama proses pembekuan semen akibat terbentuknya kristal-kristal es (Irawan 2016).

Waktu ekuilibrase adalah periode yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer supaya pada saat pembekuan kematian spermatozoa yang berlebihan dapat dicegah (Afriantini dkk,

2007). Semen harus berada dalam pengencer dengan atau tanpa gliserol selama kurang lebih 4 jam pada suhu 5°C. Waktu ekuilibrase berbeda-beda pada berbagai jenis, bangsa dan individu pejantan. Pada pembekuan semen domba, rusa, dan sapi FH waktu ekuilibrase pada suhu 5°C terbaik masing-masing adalah 2 jam, 4 jam, dan 4 jam (Arifiantini dkk., 2005)

Selain waktu ekuilibrase, waktu *pre freezing* juga berpengaruh terhadap kualitas semen beku. *Pre freezing* merupakan proses pembekuan semen dengan suhu tertentu sampai mencapai suhu yang diinginkan. Lama waktu *pre freezing* merupakan masalah penting dalam proses pembekuan semen untuk mempertahankan fertilitas spermatozoa (Rangkuti dkk., 2021).

Proses *pre freezing* dilakukan dengan cara *straw* yang telah berisi semen diletakkan pada permukaan nitrogen cair setinggi 4 cm dengan suhu berkisar -110 °C sampai -120 °C selama 9 menit (BIB Ungaran, 2011; Nilna. 2010). Selanjutnya Umar dan Maharani (2005) menyatakan bahwa *pre freezing* selama 9 menit memberikan angka persentase motilitas spermatozoa sapi Limosin sebesar 47,25%, kemudian Rangkuti dkk (2021) menambahkan bahwa *pre freezing* selama 9 menit dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa sapi Bali, namun *pre freezing* selama 11 menit memiliki motilitas lebih tinggi. Hal ini disebabkan karena spermatozoa memiliki waktu yang lebih lama untuk menyesuaikan diri dengan penurunan suhu lingkungan.

Selain waktu ekuilibrase dan waktu *pre freezing* dapat mempengaruhi kualitas semen beku, kedua faktor ini juga mempengaruhi kualitas TAU dan MPU yang ada didalam *straw*. Spermatozoa hasil pembekuan harus mampu menjaga keutuhan tudung akrosomnya agar reaksi akrosom dapat terjadi pada waktu yang

tepat dengan cara melepaskan enzim guna membantu spermatozoa dalam menembus zona pellucida (Neild dkk.,2005). Informasi mengenai waktu optimal ekuilibrase dan *pre freezing* yang dilakukan secara bersamaan belum diketahui. Hal inilah yang melatarbelakangi dilaksanakannya penelitian mengenai pengaruh lama ekuilibrase dan *pre freezing* terhadap TAU dan MPU spermatozoa sapi Bali.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh waktu ekuilibrase dan *pre freezing* terhadap persentase TAU dan MPU spermatozoa ternak sapi Bali, serta mengetahui berapa lama waktu ekuilibrase dan *pre freezing* optimal yang dapat mempertahankan kualitas spermatozoa pada saat pembekuan.

Kegunaan penelitian ini yaitu sebagai informasi kepada instansi terkait seperti BIB mengenai pengaruh waktu ekuilibrase dan waktu *pre freezing* terhadap TAU dan MPU spermatozoa ternak sapi Bali.

TINJAUAN PUSTAKA

Sapi Bali

Sapi Bali (*Bos sondaicus*) merupakan sapi asli Indonesia yang diduga sebagai hasil domestikasi dari banteng liar. Sebagian ahli yakin bahwa domestikasi tersebut berlangsung di Bali sehingga disebut sapi Bali. Sapi Bali telah tersebar hampir di seluruh provinsi di Indonesia dan berkembang cukup pesat di banyak daerah karena memiliki beberapa keunggulan. Sapi Bali mempunyai daya adaptasi yang baik terhadap lingkungan yang buruk, seperti daerah yang bersuhu tinggi, mutu pakan yang rendah/kasar, dan lain-lain (Guntoro, 2002). Matondang dan Talib (2015) menyatakan bahwa sapi Bali merupakan salah satu sapi terbaik di dunia karena memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan rumpun sapi lainnya. Hal ini antara lain adalah memiliki fertilitas dan persentase karkas tinggi serta mampu beradaptasi dengan baik pada lingkungan.

Sapi Bali memiliki karakteristik warna bulu pada pejantan berwarna merah bata kehitaman seiring pertambahan usianya. Betina berwarna merah bata, kaki berwarna putih mulai dari tarsus/carpus ke bawah, pantat berwarna putih jelas berbentuk oval, bibir atas dan bawah berwarna putih, punggung sapi Bali betina memiliki garis belut berwarna hitam, ujung ekor berwarna hitam dan bentuk tanduk meruncing kearah tengah (Abidin. 2002).

Bioteknologi Inseminasi Buatan

Untuk meningkatkan populasi ternak sapi dan untuk memenuhi kebutuhan pangan asal hewani membutuhkan indukan yang begitu banyak, namun untuk

keadaan sekarang sapi pejantan sulit didapatkan. Untuk menyelesaikan masalah ini dapat digunakan sistem IB (Dirjen Peternakan dan Kesehatan Hewan, 2012). IB merupakan salah satu teknologi yang diaplikasikan secara luas untuk mendorong swasembada daging sapi. Teknologi IB yang digunakan untuk program peningkatan mutu genetik terutama pada ruminansia besar (sapi dan kerbau) merupakan teknologi unggulan yang masih akan digunakan dalam upaya peningkatan produktivitasnya (Susilo, 2005).

Tujuan dari IB itu sendiri adalah sebagai satu alat yang ampuh untuk meningkatkan populasi dan produksi ternak secara kuantitatif dan kualitatif. Keuntungan IB pada sapi di Indonesia antara lain untuk meningkatkan mutu genetik yang lebih cepat karena menggunakan semen dari pejantan unggul, dapat menghemat biaya pemeliharaan pejantan, dan penularan penyakit (Setiawan, 2018).

Penggunaan teknologi IB berkaitan erat dengan kualitas spermatozoa yang dipengaruhi oleh faktor internal (umur, bangsa dan genetik) dan faktor eksternal (pakan, lingkungan, dan pengencer yang digunakan seperti andromed, tris kuning telur, dan lain-lain). Saat ini program IB yang populer adalah menggunakan semen beku, dengan keuntungan mengurangi jumlah penggunaan pejantan karena satu ekor pejantan lebih mahal dibanding harga semen beku, mengurangi risiko menyebarnya penyakit, meningkatkan potensi pemilihan genetik yang terbaik, dan meningkatkan keamanan untuk pejantan (Shehu dkk., 2010).

Semen Beku

Semen beku adalah semen yang telah diberi penambahan pengencer untuk memberikan nutrisi pada semen, dengan tujuan meningkatkan kualitas semen

yang disimpan dengan keadaan beku dalam *container* yang berisi nitrogen cair dengan suhu -196°C . Semen beku yang berkualitas baik ditunjukkan dengan persentase motilitas dan persentase hidup *post thawing* yang tinggi (Aini dkk., 2014). Semen beku memiliki keunggulan yaitu dapat disimpan dalam jangka waktu lama, namun memiliki kelemahan penurunan kualitas semen selama proses pembekuan karena melewati berbagai suhu ekstrim yang dapat menurunkan kualitasnya (Komariah dkk., 2013).

Produksi semen beku melalui beberapa tahapan, salah satunya adalah tahap pengenceran yang bertujuan melindungi semen saat pembekuan pada suhu rendah. Masalah yang sering terjadi pada proses ini adalah kejut dingin (*cold shock*) dan kerusakan sel akibat terbentuknya kristal es pada fase beku, sehingga dibutuhkan pengencer yang mempunyai sifat krioprotektan baik ekstraseluler maupun intraseluler (Sudarmanto dkk., 2015).

Pemberian agen protektan tersebut diharapkan dapat melindungi membran plasma dan isi sel secara keseluruhan dari kerusakan fisik dan fungsional pada saat dan selama proses pembekuan semen. Hal yang perlu diperhatikan pada proses pengenceran semen adalah waktu gliserolisasi yaitu waktu yang diperlukan gliserol untuk menyesuaikan diri dengan pengencer karena titik kritis keberhasilan pembekuan semen ditentukan pada proses ini. Disamping fungsinya sebagai krioprotektan, gliserol juga bersifat *toxic*, sehingga beberapa peneliti menganjurkan untuk melakukan pemberian gliserol sesaat sebelum pembekuan (Yusuf dkk., 2006) sehingga perlu adanya pengetahuan mengenai waktu optimal dalam proses gliserolisasi.

Tudung Akrosom Utuh

Tudung akrosom utuh (TAU) adalah salah satu variabel penting dari kualitas spermatozoa yang memiliki peranan sentral dalam menentukan keberhasilan fertilisasi, sehingga harus tetap terjaga keutuhannya hingga terjadi kapabilitas. TAU merupakan suatu struktur yang berbentuk topi yang menutupi dua per tiga bagian anterior kepala. Bagian akrosom meliputi bagian *apical segment* (membran terluar), *principal segment* (tudung akrosom) dan *equatorial segment*. Tudung akrosom memiliki enzim hyaluronidase, akrosin, dan *corona penetrating enzyme* (CPE) yang berfungsi untuk melisiskan zona pellusida sebagai jalur masuknya spermatozoa ke dalam sitoplasma ovum pada saat proses fertilisasi. Tudung akrosom yang rusak akan menyebabkan enzim-enzim keluar dan kemampuan spermatozoa saat fertilisasi akan menurun. Tudung akrosom perlu tetap utuh sebelum diinseminasikan agar enzim yang ada didalamnya dapat dilepaskan saat sperma sudah mencapai ovum di dalam organ reproduksi betina (Fikri dkk.,2020).

Proses metabolisme spermatozoa saat di inkubasi terlalu lama menghasilkan reaksi peroksidatif lipid apabila bereaksi dengan radikal bebas. Peroksidasi lipid dapat mengubah struktur sel sperma sehingga menyebabkan mantel pelindung kepala sperma pecah dan berakibat rusaknya TAU spermatozoa. Kualitas TAU yang rendah dapat disebabkan akibat pengaruh kimiawi dalam media pengencer serta pengaruh mekanik seperti gesekan dengan partikel pengencer atau dengan dinding tabung. Selain itu, kerusakan tudung akrosom dapat berasal dari abnormalitas primer atau berasal dari kegagalan dalam proses

spermatogenesis berupa aparatus golgi dari spermatid yang tidak membentuk tudung akrosom (Ondho, 2020).

Kualitas tudung akrosom dari spermatozoa sangat mempengaruhi terjadinya proses kapasitasi dan reaksi akrosom. Kapasitasi adalah proses persiapan atau perubahan fisiologis yang dialami spermatozoa dengan cara melepaskan bahan-bahan pelapis membran spermatozoa secara bertahap, terutama pada bagian akrosom untuk meningkatkan daya fertilitasnya (Susilawati, 2011). Sedangkan, reaksi akrosom merupakan proses pelepasan enzim penetrasi yang memungkinkan spermatozoa dapat menembus zona pellusida dan membuahi ovum. Namun, apabila reaksi akrosom terjadi sebelum spermatozoa mencapai tempat fertilisasi, spermatozoa akan kehilangan kemampuan untuk memfertilisasi oosit (Neild dkk., 2005).

Membran Plasma Utuh

Membran plasma utuh (MPU) spermatozoa merupakan bagian yang berfungsi untuk mengatur lalu lintas keluar masuknya semua substrat dan elektrolit dari sel yang dibutuhkan dalam proses metabolisme bagi spermatozoa. Metabolisme sel akan berlangsung baik jika membran plasma sel berada dalam keadaan yang utuh (Surachman dkk., 2009). Keutuhan membran plasma spermatozoa secara fisiologis berperan untuk melindungi dan mempertahankan motilitas spermatozoa di dalam saluran reproduksi betina, kapasitasi, dan fertilisasi karena secara langsung maupun tidak langsung membran plasma memiliki kemampuan untuk berinteraksi dan menempel pada *cumulus oophorus* (Matrinez, 2003).

Membran plasma spermatozoa tersusun atas lipid (phospholipid, glikolipid, dan kolesterol) dan protein. Phospholipid dan glikolipid merupakan senyawa asam lemak tak jenuh ganda sehingga mudah berikatan dengan radikal bebas. Kerusakan struktur membran akan mengganggu metabolisme sel spermatozoa. Metabolisme yang tidak sempurna akan menghasilkan radikal bebas yang sangat reaktif yang mudah berikatan dengan asam lemak tak jenuh yang terkandung di dalam membran spermatozoa yang akan menyebabkan kerusakan membran. Kerusakan pada membran spermatozoa akan menyebabkan kehilangan motilitas, perubahan metabolisme yang cepat, perubahan morfologi, lepasnya tudung akrosom dan pelepasan komponen intraseluler (Isnaini, 2011).

Untuk mampu melindungi spermatozoa dari kerusakan selama proses pendinginan dibutuhkan waktu ekuilibrase yang tepat agar terjadi perlindungan yang optimal. Waktu ekuilibrase yang terlalu cepat akan membuat gliserolisasi yang belum sempurna yang akan membuat persentase MPU spermatozoa rendah. Hal ini terjadi karena gliserol belum sepenuhnya masuk ke dalam sel dan belum sepenuhnya mengikat fosfolipid sehingga pada spermatozoa terjadi kerusakan akibat pembekuan. Sedangkan waktu ekuilibrase yang lama akan menurunkan persentase MPU karena waktu ekuilibrase yang panjang akan merusak struktur membran. Pada waktu ekuilibrase gliserol akan memasuki sel-sel spermatozoa untuk menggantikan dari sebagian air yang ada di dalam sel, tetapi dengan waktu ekuilibrase yang lebih lama kemungkinan gliserol bersifat *toxic* sehingga akan merusak membran plasma spermatozoa dan menyebabkan gangguan motilitas dan viabilitas spermatozoa (Muzakkir dkk., 2017). Selanjutnya ditambahkan oleh Aku dkk (2007) bahwa akibat efek *toxic* dari gliserol menyebabkan membran plasma

spermatozoa akan mengalami modifikasi struktur dan mengakibatkan terganggunya transport aktif zat-zat yang menjadi sumber energi bagi spermatozoa seperti glukosa, asam amino, dan asam lemak. Akibat terganggunya mekanisme ini spermatozoa akan kekurangan energi sehingga viabilitas serta motilitasnya menurun.

Hypoosmotic Swelling Test (HOST) adalah metode khusus untuk menguji keutuhan membran plasma spermatozoa. HOST mulai diperkenalkan pada 1963 oleh Drevious yang menemukan bahwa spermatozoa yang terpapar pada medium *hipoosmotik* akan mengalami pembengkokan ekor seperti spiral. Hal tersebut merupakan akibat gangguan kontraksi-relaksasi ekor karena adanya aliran ion (Jeyendran dkk., 1984). Spermatozoa akan bereaksi ketika dimasukkan ke dalam larutan *hipoosmotik*. Hal ini terjadi karena larutan *hipoosmotik* akan masuk ke dalam sel melewati membran plasma. Akibat perbedaan tekanan osmotik dari larutan tersebut dengan tekanan osmotik luar sel lebih tinggi, maka larutan tersebut akan masuk ke sel dan menyebabkan pembengkakan. Fenomena inilah yang dapat diamati dan diukur untuk menguji integritas membran plasma. Fenomena ini lebih mudah diamati pada ekor spermatozoa daripada kepala karena membran plasma yang mengelilingi ekor tampak lebih longgar (Vazquez dkk., 1997). Spermatozoa dengan ekor melingkar menunjukkan bahwa membrane plasma spermatozoa tersebut masih utuh (Ahmad dkk., 2003). Membran plasma sangat berperan dalam terjadinya proses fertilisasi sehingga pengujian terhadap keutuhan membran plasma adalah indikator yang sangat penting untuk memprediksi daya fertilitas spermatozoa (Uysal dan Korkmaz, 2004).